

ФРАКЦИОНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭТИЛЕНИМИНА И ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ ОТ ДОЗЫ МУТАГЕНА

П. Я. Шварцман, В. М. Кузнецов

Количественный анализ индуцированного мутационного процесса, применяемый особенно широко в радиационной генетике, является одним из надежных методов изучения механизма возникновения мутаций. При химическом мутагенезе на трансформирующем агенте (Бреслер, Перумов, 1962), на бактериях (Lowless, 1959), на корешках *Vicia faba* и в культуре ткани (Rieger a. Michaelis, 1965), а также на дрозофиле (Nasrat a. oth., 1954), как правило, обнаруживается прямолинейная зависимость частоты мутаций от дозы. Предполагается, что подобного типа дозовая зависимость является отражением мономолекулярного акта возникновения мутации гена.

Однако очевидно, что химические мутагены, особенно алкилирующие соединения, являясь высокоактивными веществами, способны вступать в клетке в различные реакции с белками, витаминами, предшественниками нуклеиновых кислот (Росс, 1964) и уже затем в качестве «вторичных» мутагенных соединений реагировать с ДНК хромосом (Сидоров и др., 1966). Именно эта конечная реакция выявляется при анализе дозовой зависимости действия мутагена на отдельные клетки. Еще менее вероятным кажется прямое взаимодействие мутагена с хромосомами половых клеток при воздействии на организм, обладающий системными физиологическими защитными механизмами (Лобашев, 1947).

Подобная опосредованность действия химических мутагенов может сказаться на длительности развития повреждений и должна характеризоваться иными временными показателями, нежели при радиационном мутагенезе, где, по-видимому, большую роль играет прямое взаимодействие квантов энергии с генетическим материалом. В радиационной генетике для определения этапов мутационного процесса во времени используются дополнительные воздействия — высокая температура, аноксия, радиопротекторы, или производится облучение дозами разной мощности однократно или фракционированно.

В связи с особенностями химического мутагенеза эксперименты с фракционированным воздействием позволяют в какой-то мере оценить многоэтапность и опосредованность этого процесса. В настоящей работе изучался эффект алкилирующего соединения — этиленимина при фракционированном и непрерывном воздействии разными дозами. Воздействию были подвергнуты трехсуточные самцы радиочувствительной (Волчков, Воробцова, 1964) линии дикого типа P-86 *Drosophila melanogaster*. Анализировалась частота рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций в зрелой сперме по методике Меллер-5.

Из всех методов воздействия химическими мутагенами на дрозофилу (введение в корм, инъекции и т. д.) для наших целей единственно приемлемым является воздействие мутагеном в газовой фазе. Самцов дрозофилы по 25 особей в пробирке с агаром, закрытой двумя слоями марли, помещали в эксикатор объемом 1,5 л, куда заливали по 5 мл раствора этиленимина разных концентраций (2; 1; 0,5; 0,25%). Воздействие осуществлялось при постоянной температуре +25°. Дозу измеряли временем экспозиции мух в атмосфере мутагена (4, 8 и 12 ч). Воздействие в течение 8 ч производилось непрерывно или двумя четырехчасовыми фракциями с интервалом между ними в 4 ч, в течение которых мухи на свежей питательной среде находились в термостате. При фракционировании двенадцатичасового воздействия (6+6) интервал был равен также 4 ч.

Таблица 1

Зависимость частоты мутаций от дозы этиленimina при однократном и фракционированном воздействиях

Концентрация (в %)	Экспозиция в часах	Число исследованных хромосом	Число леталей	Количество леталей (в %)	t_{diff}	K
2,00	4	446	27	$6,1 \pm 1,13$	} 3,8	1,70
	8	794	65	$8,2 \pm 0,97$		
	4+4	804	112	$13,9 \pm 1,22$		
1,00 (1-я повторность)	4	218	16	$7,3 \pm 1,42$	} 2,8	1,65
	8	255	29	$11,3 \pm 1,81$		
	4+4	343	64	$18,7 \pm 1,90$		
	12	260	50	$18,8 \pm 2,50$		
1,00 (2-я повторность)	4	560	37	$6,6 \pm 1,07$	} 2,0	1,56
	8	350	30	$8,6 \pm 1,50$		
	4+4	297	40	$13,4 \pm 1,95$		
	12	495	61	$12,3 \pm 1,49$		
0,50	4	445	32	$7,5 \pm 1,10$	} 1,3	1,24
	8	449	46	$10,2 \pm 1,47$		
	4+4	530	67	$12,7 \pm 1,48$		
	12	509	65	$12,8 \pm 1,49$		
0,25	6+6	516	86	$16,7 \pm 1,83$	} 0,8	0,89
	4	500	31	$6,2 \pm 1,08$		
	8	823	96	$11,6 \pm 1,11$		
	1+4	875	91	$10,4 \pm 1,01$		
	12	394	54	$13,7 \pm 1,74$		

В табл. 1 собраны данные, полученные при использовании различных концентраций этиленimina. Нами не объединены данные двух повторностей с концентрацией 1%, так как в этом случае имеются достоверные различия по частоте мутаций при двенадцатичасовой экспозиции. На рисунке графически изображена дозовая зависимость частоты мутаций при концентрации 1% (2-я повторность опыта). Эта дозовая зависимость соотносена со спонтанной частотой мутаций, которая, по данным К. В. Ватти (см. наст. сборник), составляет 0,47% для данной линии. Так как мы предполагали линейную зависимость частоты мутаций от дозы агента, то и вычисляли поэтому уравнения прямолинейной регрессии для концентрации 1,00 (1-я и 2-я повторности порознь), 0,50 и 0,25%. Эти уравнения соответственно следующие:

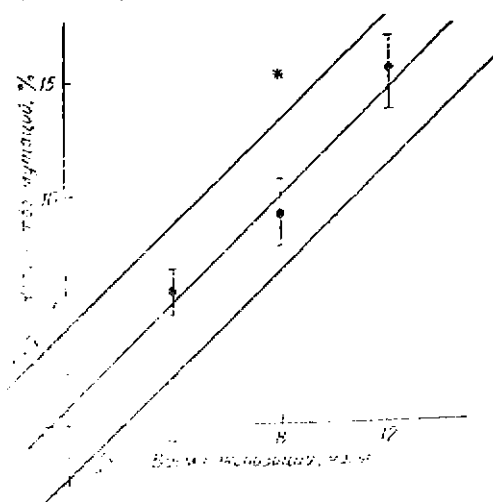
$$\begin{aligned} y &= 1,0 + 1,43x & y' &= 1,4 + 0,91x' \\ y'' &= 1,8 + 0,90x'' & y''' &= 1,2 + 1,12x''' \end{aligned} \quad (\text{рис. 1}).$$

Были оценены границы вариабильности теоретической линии регрессии ($P=0,05$), а также экспериментальных частот мутаций по взвешенной ошибке ($P=0,05$). На указанных концентрациях наблюдается прямолинейная зависимость частоты мутаций от дозы этиленimina, измеренной временем экспозиции мух в атмосфере мутагена.

В опытах с концентрацией этиленimina 2 и 1% наблюдается достоверное повышение частоты мутаций при фракционированном воздействии, по сравнению с непрерывным воздействием в течение 8 ч. При концентрации 0,5% эти различия недостоверны, однако наблюдается та же тенденция, подкрепляемая данными по фракционированию двенадцатичасовой экспозиции (6+6). При концентрации 0,25% различий не наблюдается. Для каждой концентрации вычислено отношение (K) частоты мутаций при фракционированном воздействии к таковой

при непрерывном воздействии. Как видно из табл. 1, с понижением концентрации величина этого отношения (K) понижается.

Те же самые данные сгруппированы в табл. 2 для оценки зависимости частоты мутаций от концентрации этиленimina. Данные табл. 1 показывают, что при 4 ч экспозиции в диапазоне концентраций от 0,25 до 2% между частотами мутаций не наблюдается различий. При 8 ч



Зависимость частоты мутаций от дозы этиленимина, измеренной временем экспозиции мух в парках мутагена.

Средние значения частоты мутаций при фракционированном воздействии.

действия между максимальной частотой (0,25%) и минимальной частотой (2%) таин различия достоверны ($t_{\text{кр}}=3$). Достоверные различия наблюдаются также при 12 ч воздействия и результатами двух опытов с концентрацией ($t_{\text{кр}}=2,2$). Эти различия, однако, разнонаправлены и могут быть случайны. Для уточнения зависимости частоты мутаций от концентрации мутагена был составлен специальный эксперимент, результаты которого приведены в табл. 3. Опыт показал, что в изученном диапазоне концентраций с повышением таковой выход мутаций не увеличивается.

Судя по данным табл. 1 и рисунка 1, при данных условиях частота мутаций прямолинейно зависит от дозы, измеренной временем экспозиции мух в атмосфере мутагена. Подобного типа прямолинейная зависимость, описанная также для этиленимина И. А. Рапопорт (1962), является, на наш взгляд, суммой от наложения определенных зависимостей скорости разнообразных промежуточных реакций, протекающих на подступах к генетическому материалу, от дозы мутагена.

При анализе рецессивных леталей, возникающих у дрозофилы действием радиации, было выяснено, что эффект отдельных фракций излучения суммируется и что результаты однократного и дробного излучения той же дозой не различаются (Ли, 1963). Аддитивный эффект

Табл. 2
Зависимость частоты мутаций от концентрации этиленимина при разных экспозициях

Концентрация (в %)	Экспозиция		
	4 часа	8 часов	12 часов
0,25	6,2 ± 1,08	11,6 ± 1,11	13,7 ± 1,74
0,50	7,5 ± 1,10	10,2 ± 1,47	12,8 ± 1,49
1,00	7,3 ± 1,42	11,3 ± 1,81	13,8 ± 2,50
(1-я повторность)			
1,00	6,6 ± 1,07	8,6 ± 1,50	12,3 ± 1,43
(2-я повторность)			
2,00	6,1 ± 1,13	8,2 ± 0,97	—

по частоте рецессивных летальных мутаций также наблюдался при комбинированном действии радиации и иприта (Auerbach, 1949; Oster, 1958).

В наших опытах при некоторых случайных колебаниях эффект фракционированного воздействия почти в два раза превышает результат отдельной четырехчасовой экспозиции. Сравнение частоты мутаций при фракционированном и при непрерывном восьмичасовом воздействии с теоретически ожидаемыми при допущении аддитивности фракций (табл. 4) показывает, что между теоретически ожидаемыми частотами и результатами при фракционированном воздействии достоверных различий не наблюдается. Однако почти во всех случаях при восьмичасовой непрерывной экспозиции мутаций достоверно меньше, чем следует ожидать теоретически. Подобного понижения нет только при концентрации 0,25%. Если рассматривать данные с точки зрения аддитивности эффекта каждой фракции, то следует допустить, что в ходе длительного воздействия высокими концентрациями в какой-то момент включается механизм по инактивации поступающего мутагена.

Таблица 3

Зависимость частоты мутаций от концентрации этиленимина при 8 часах непрерывного воздействия

Концентрация (в %)	0,25	0,50	0,75	1,00
Число исследованных хромосом	399	364	439	447
Число леталей	34	33	48	44
Количество леталей (в %)	8,8 ± 1,41	9,1 ± 1,51	10,9 ± 1,48	9,8 ± 1,40

Таблица 4

Сравнение экспериментальных результатов с теоретически ожидаемыми при допущении аддитивности фракций

Концентрация (в %)	Количество леталей (в %) при экспозициях				$t_{\text{ант}}$	
	1 ч (эксперим.)	4 ч + 4 ч (эксперим.)	4 ч + 4 ч (теоретич.)	8 ч (эксперим.)	4 ч + 4 ч (теоретич.)	8 ч (эксперим.)
2	6,1 ± 1,13	13,9 ± 1,22	12,2 ± 1,66	8,2 ± 0,97	0,82	2,08
1 (1-я повторность)	7,3 ± 1,42	18,7 ± 1,90	14,6 ± 2,15	11,3 ± 1,81	1,42	1,17
1 (2-я повторность)	6,6 ± 1,07	13,4 ± 1,95	13,2 ± 1,57	8,6 ± 1,50	0,08	2,12
0,5	7,5 ± 1,10	12,7 ± 1,48	15,0 ± 1,62	10,2 ± 1,47	1,05	2,18
0,25	6,2 ± 1,08	10,4 ± 1,01	12,4 ± 1,59	11,6 ± 1,11	1,06	0,042

С другой стороны, можно представить, что в четырехчасовом интервале между воздействиями при высоких дозах мутаген, накопившийся в организме после первой фракции, продолжает работать с той же эффективностью или с несколько меньшей, в зависимости от дозы. Тогда эффект от фракционированного воздействия большими дозами должен сравниваться не с результатами восьмичасовой непрерывной экспозиции, а с таковыми при 12 ч непрерывного воздействия — 4 + (4) + 4, т. е. интервал 4 ч должен суммироваться со временем экспозиции. Согласно данным табл. 1, равенство результатов двукратной четырехчасовой обработки с интервалом 4 ч и двенадцатичасовой обработки не вызывает сомнений.

Если при фракционировании двенадцатичасовой экспозиции интервал 4 ч включить в общее время воздействия — 6 + (4) + 6 (табл. 1,

концентрация 0,5%), то мы должны были бы ожидать равенства этого варианта с результатами экспозиции 16 ч. Исходя из предположения регрессии для прямолинейной зависимости от дозы частоты мутаций при этой концентрации, получаем, что при 16 ч непрерывного действия можно ожидать 16,2% мутаций. В опыте, в варианте получаем 16,7%. Это согласуется с нашей гипотезой.

Следует обсудить также обнаруженное в наших опытах отсутствие зависимости частоты мутаций от концентрации мутагена. Подобная ситуация могла бы быть связана с тем, что в эксикаторе, где проводилась обработка, при высоких концентрациях происходит предельное насыщение парами этиленimina, и дальнейшее повышение концентрации в растворе не увеличивает концентрацию этиленimina в воздухе. Такому объяснению, однако, противоречит уменьшение отношения частоты мутаций при фракционированном воздействии к таковой при непрерывном воздействии (К) с понижением концентрации мутагена.

Скорее всего при действии на дрозофилу парами этиленimina происходит насыщение организма мутагеном. При определенных концентрациях это насыщение становится предельным, и частота мутаций не зависит от концентрации агента, а зависит только от длительности контакта, и повышение концентрации влияет только на длительность сохранения мутагена в тканях организма. Тогда при одинаковых частотах мутаций в случаях непрерывного воздействия должны наблюдаться различия в тех вариантах, где можно как-то оценить длительность действия мутагена в организме. На наш взгляд, это хорошо иллюстрируется изменением эффекта фракционирования с понижением концентрации этиленimina (см. табл. 1).

Таким образом, мы предполагаем, что за наблюдаемые в опытах различия в частоте мутаций, возникающие при однократном и фракционированном воздействии, ответственна сложная система организма мушкетера, по мнению М. Е. Лобашева (1947), должна участвовать в регулировании скорости мутационного и других генетических процессов.

ВЫВОДЫ

1. Показана линейная зависимость частоты сцепленных с полем рецессивных летальных мутаций от исследованных доз этиленimina измеренных временем экспозиции мух в парах мутагена.

2. В диапазоне концентраций этиленimina от 0,25 до 2% зависимости частоты мутаций от концентрации мутагена не обнаружено.

3. При концентрациях этиленimina 2, 1 и 0,5% обнаружено понижение частоты мутаций при фракционированном воздействии по сравнению с однократным воздействием; при концентрации 0,25% такое понижения частоты мутаций не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

- Бреслер С. Е. и Д. А. Перумов. 1962. «Биохимия», 27, 5: 927—931.
Волчков Ю. А. и И. Е. Воробцова. 1964. Вестник ЛГУ, 15: 124—128.
Ли Д. Е. 1963. Действие радиации на живые клетки. М. ИЛ.
Лобашев М. Е. 1947. Вестник ЛГУ, 8: 20—29.
Рапопорт И. А. 1962. Бюлл. Моск. о-ва испыт. природы, 57, 4: 109—123.
Росс У. 1964. Биологические алкилирующие вещества. Изд. «Медицина».
Сидоров Б. Н., Н. Н. Соколов и В. С. Андреев. 1966. «Генетика» 25—34.
Auerbach C. 1949. Biol. Rev., 24: 355—391.
Lowless H. J. 1959. «Nature», 184: 1780—1782.
Nasrat G. E., W. D. Kaplan and C. Auerbach. 1954. Zs. ind. Abst. u. Vererb. Lehre, 89, 1: 249—262.
Oster I. I. 1958. Zs. ind. Abst. u. Vererb. Lehre, 89: 1—6.
Rieger R. u. A. Michaelis. 1965. Chromosoma, 16, 1: 17—21.